Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie der Universität Tübingen

Möglichkeiten und Grenzen der präparativen Herstellung von Thrombozyten- und Granulozytenkonzentraten unter besonderer Berücksichtigung der intermittierenden Thrombopherese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Georg Ulrich Wollmann
aus Berlin

1981

Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. W. Schneider
des Zentralinstituts für Anaesthesiologie der Universität Tübingen

Möglichkeiten und Grenzen der präparativen Herstellung von Thrombozyten- und Granulozytenkonzentraten unter besonderer Berücksichtigung der intermittierenden Thrombopherese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Georg Ulrich Wollmann
aus Berlin

1981

Dekan:	Professor Dr. K. Voigt
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Schneider
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Schorer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	ALLGEMEINE GRUNDLAGEN	2
2.1.	Physiologische Grundlagen der Zellkomponenten	2
2.1.1.	Die Erythrozyten	5
2.1.2.	Die Thrombozyten	7
2.1.3.	Die Leukozyten	12
2.2.	Indikation zur Thrombozyten- und Granulozytenkonzentration	14
2.3.	Herstellung von Blutbestandteilpräparationen	15
2.3.1.	Die Gravitationsleukapherese	17
2.3.2.	Die kontinuierliche Zellseparationsmethode	22
2.3.3.	Die intermittierende Zellseparationsmethode	27
2.4.	Biochemische Möglichkeiten zur vermehrten Gewinnung von Granulozyten	31
3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	Erfahrungen mit einem eigenen Verfahren der intermittierenden Thrombozytopherese	34
3.1.1.	Benötigte Geräte und Methode	34
3.1.2.	Ergebnisse	38
3.2.	Modifikation der IFC mit dem Haemonetics model 30	43
3.2.1.	Methodik und Ergebnisse	43
4.	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	50
5.	LITERATUR	55

1. EINLEITUNG

Schwere Thrombozytopenien verschiedenster Genese, Granulozytopenien, Gerinnungsstörungen infolge Mangel unterschiedlicher Gerinnungsfaktoren und nicht zuletzt die immunhämatologischen Aspekte bei Vollbluttransfusionen haben die Notwendigkeit einer Hämotherapie nach "Maß" evident werden lassen. Darunter versteht man das Bemühen nur jene Komponenten des Blutes zu transfundieren, die das Krankheitsbild des Patienten erfordert.

Bezogen auf die Gewinnung von Blutzellbestandteilen kommt zunächst die übliche Blutspende mit anschliessender Separation der benötigten Zellen aus der gespendeten Blutkonserve. Diese Methode ist vor allem zur Gewinnung von Erythrozytensedimenten geeignet. Zahlenmäßig ungenügend ist die auf diese Weise erreichbare Präparation von Thrombozyten bzw. Granulozyten. Günstigere Ergebnisse sind mit einer sog. Blutkomponentenspende zu erzielen, wobei unter Anwendung bestimmter Zellseparationsverfahren während der Blutspende selbst die benötigten Zellen getrennt werden und dem Spender das gespendete Blut zurückgegeben wird.

Zur Herstellung von isolierten Blutbestandteilpräparationen haben sich folgende Verfahren etabliert:

1. Einfache Sedimentation einer Blutkonserve mit und ohne Sedimentationsbeschleuniger,

2. einfache Zentrifugation einer Blutkonserve zur schnelleren Gewinnung der jeweiligen Blutkomponente,

3. intermittierend und kontinuierliche Leuka- bzw. Thrombopherese unter Anwendung von speziellen Zentrifugen,

4. Filtrationsleukapherese (im allgemeinen zur Gewinnung von Granulozyten).

Aufgabe dieser Arbeit ist es, Vor- und Nachteile der auf Zentrifugationsbasis beruhenden Methoden gegeneinander abzuwägen und aufgrund eigener Untersuchungsergebnisse Verbesserungen bei der präparativen Herstellung von Thrombozytenkonzentraten vorzuschlagen.

2. ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

2.1. Physiologische Grundlagen der Zellkomponenten

Das menschliche Blut stellt sich als ein mit chemischen, biochemischen, physikalischen und physiologischen Eigenschaften wohl definiertes Plasma dar, in welchem die korpuskulären Elemente Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, Phagozytose, immunologischer Aufgaben, Gerinnung etc.) existieren und deren mengenmäßiger Anteil am Gesamtvolumen der sog. Hämatokrit widerspiegelt, s. Tabelle 1.

Tabelle 1

	Vollblut	Serum
Gesamtblutvolumen[1] (ml/kg KG)	71,4	GE 7 g% Albumine 4 g% Globuline 3 g%
spezifisches Gewicht	1,050-1,062	1,062
Osmotischer Druck (bei 0°C)		5030 Torr bei 0°C 5852 Torr bei 38°C
kolloidosmotischer Druck		25 Torr
absolute Viskosität	2,7 Centipoise	
BSG Blutsäule 200 mm, Ø 2,5 mm 20% Verdünnung mit Na-Citrat	nach 1 Std. 7-11 mm nach 2 Std. 8-16 mm nach 24 Std. 50-70 mm	
Oberflächenspannung		27 dyn/cm
Spezifische Leitfähigkeit		0,01190/Ω.cm
Blutungszeit (kapillare)	150"	
Gerinnungszeit	5' - 9'	
pH	7,35 - 7,45	
Gefrierpunktserniedrigung	0,56°C	

[1]) Plasma
Fibrinogen 200 - 400 mg%
Gesamtblutvolumen
41,1 ml/kg KG (Plasma)

Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten werden im Knochenmark (pluripotente Stammzelle: Erythro-, Myelo-Megakariopoese) gebildet, Vorstufen der Lymphozyten finden sich dagegen nur zu einem geringen Teil im Knochenmark; sie werden überwiegend in den Lymphknoten und dem lymphatischen Gewebe gebildet und gelangen über den Ductus thoracicus in das periphere Blut. Die Zellproduktion ist hoch: stündlich werden etwa 9×10^9 Erythrozyten und 2×10^8 Granulozyten in das Blut freigegeben.

Tabelle 2

Gesamtzahl, Überlebenszeit und Produktionsraten

	Lebensdauer (Tage)	Anzahl/µl	Produktionsraten
Erythrozyten	100	5×10^6	2×10^{11} /Tag
Thrombozyten	10	$2{,}5 \times 10^5$	$2{,}8 \times 10^9$ /Tag und kg KG
Granulozyten	<1	5×10^3	16×10^8 /Tag und kg KG

2.1.1. Die Erythrozyten

Der Erythrozyt stellt eine runde bikonkave Scheibe von 7 bis 8 μ Durchmesser und ca. 2,4 μ Dicke dar und dient hauptsächlich aufgrund seines Hämoglobingehaltes und dem O_2-CO_2-Transport. Die Knochenmarkserythropoese bzw. die Hämoglobinsynthese wird bei einem Blutverlust, z.B. durch das Erythropoetin induziert, dessen vermehrte Produktion aufgrund der durch eine Erniedrigung der Erythrozytenkonzentration bedingten Hypoxie zurückzuführen ist.

Die folgende Tabelle 3 gibt die wichtigsten Daten.

Tabelle 3

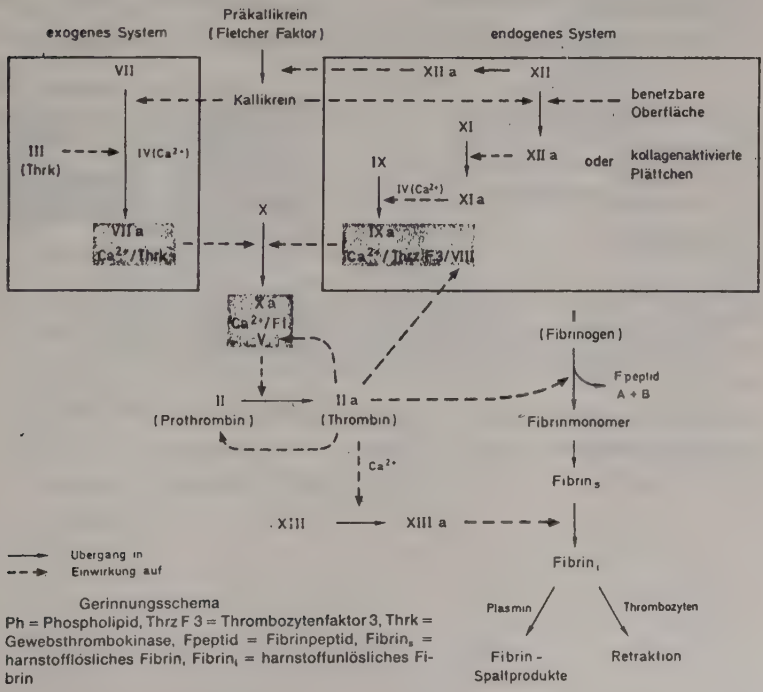
DER ERYTHROZYT

Erythrozytendurchmesser	7,2 µ
Erythrozytendicke	2,1 µ
Erythrozytenoberfläche	140 µ
Erythrozytenvolumen	82 - 92 μ^3
Erythrozyten Hb-Gehalt (Hb_E)	27 - 34 pg
MCHC	32 - 36%
Erythrozytenzahl	4,5 (♀) - 5,0 (♂) x 10^6/ul
Hämoglobingehalt	14 g% (♀) bzw. 16 g% (♂)
Hämatokrit	16-42% (♀) bzw. 40-48% (♂)
Eisengehalt d. Gesamt-Erys	2,5 g
O_2-Bindungskapazität	1,34 g O_2 / 1 g Hb
spezifisches Gewicht	1,093 - 1,096
elektrische Ladung	- 16,8 mV
elektrophoretische Beweglichkeit	- 1,31 x 10^{-4} cm^2/V.s
Osmotische Resistenz	0,45-0,39% NaCl (beginnende Hämolyse)
Lebensdauer	~120 Tage
Proliferation und Reifungszeit im Knochenmark	~ 7 Tage

Die Indikation zur Erythrozytentransfusion ergibt sich bei akuten und chronischen Anämien mit der klinischen Ausbildung anämiebedingter Symptome.

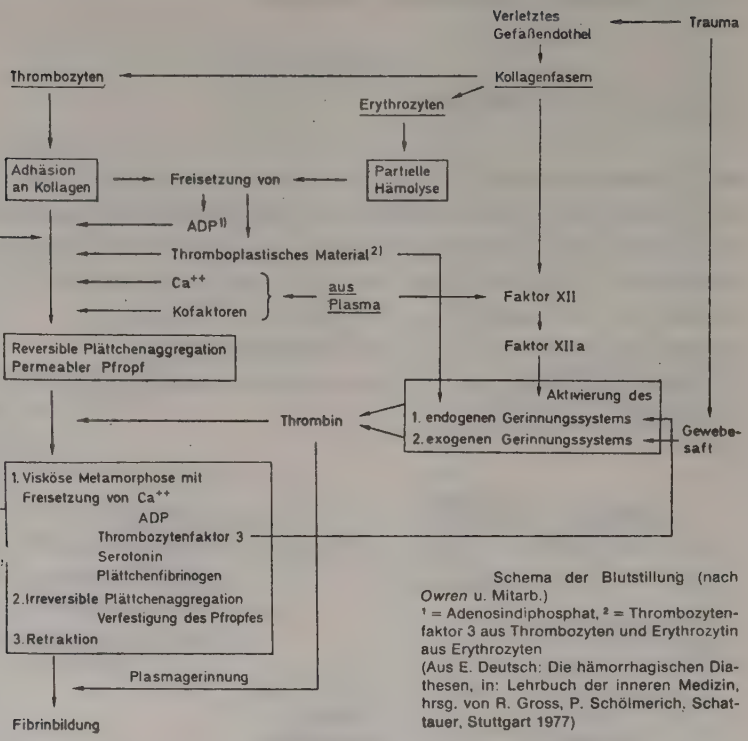
2.1.2. Die Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl im menschlichen Blut beträgt ungefähr 150.000 bis 450.000 pro ml, ihr Durchmesser beträgt ca. 2,3 u, das spezifische Gewicht 1,040 und die Überlebenszeit 7 bis 10 Tage; ca. 2,8 x 10^9 Thrombozyten werden pro kg KG und Tag produziert. Ihre physiologische Aufgabe besteht in der Gefäßabdichtung (Thrombusbildung) und in der Gerinnungsphysiologie (s. Tabellen 4 und 5).



Gerinnungsschema
Ph = Phospholipid, Thrz F 3 = Thrombozytenfaktor 3, Thrk = Gewebsthrombokinase, Fpeptid = Fibrinpeptid, Fibrin$_s$ = harnstofflösliches Fibrin, Fibrin$_l$ = harnstoffunlösliches Fibrin

Tabelle 5



Schema der Blutstillung (nach *Owren* u. Mitarb.)
¹ = Adenosindiphosphat, ² = Thrombozytenfaktor 3 aus Thrombozyten und Erythrozytin aus Erythrozyten
(Aus E. Deutsch: Die hämorrhagischen Diathesen, in: Lehrbuch der inneren Medizin, hrsg. von R. Gross, P. Schölmerich, Schattauer, Stuttgart 1977)

Ungefähr 2/3 der täglich produzierten Thrombozyten findet man im peripheren Blut, während sich 1/3 in der Milz aufhält.
Tabelle 6 enthält die wichtigsten Daten der Thrombozytenjinetik:

Tabelle 6

THROMBOZYTENKINETIK	
Megakaryozytenzahl im KM	6,1 x 10^6/kg KG
1 Megakaryozyt bildet 49 Thrombozyten pro Tag	
Thrombozytenreifungszeit	5 - 10 Tage
Umsatzrate	35.000 ± 4.300/µl x Tag
Normalbereich	150.000 - 450.000/µl
Speicherung	30% in der Milz
Abbauort	Milz
Lebenszeit	9,9 ± 0,6 Tage

nach QUEISSER

Folgende Tabelle 7 gibt die in vivo Recovery bei einer sofortigen Bestimmung nach der Transfusion sowie Lagerung bei 22°C in % der transfundierten Thrombozyten an:

TAGE	0	1	2	3	4
Vollblut ca. 400 ml	65	58	50	30	0
PRP bis 1000 ml[1)]	55	45	35	20	0
PC bis 300 ml[2)]	35	20	10	5	0

1) Das Plasmavolumen ist abhängig von der Separationstechnik (separiertes extrakorporales Volumen, g-Zahl bzw. Trennzeit)

2) wie 1), außerdem haben Untersuchungen ergeben, daß bei höheren Plasmaanteilen eine höhere in vivo-Recovery zu erwarten ist

50% der transfundierten isotopenmarkierten Plättchen verschwinden innerhalb von 4 Tagen (ABRAHAMSEN, 1970). Wiederholte Transfusionen über mehrere Wochen lassen Thrombozytenantikörper entstehen und lassen weitere Plättchentransfusionen fragwürdig erscheinen (GRUMET u. YANKEE, 1970). Eine größere Toleranz dagegen besteht bei Patienten unter immunsupressiver Therapie (FREIREICH, 1963).

Die transfusionsmedizinische Voraussetzungen sind demnach neben einem Ausschluß von thrombozytärer Antikörper, z.B. mittels der Thrombozytenimmunfluoreszenzmethode sowie die in der Literatur unterschiedlichen Meinungen über die Notwendigkeit einer Berücksichtigung der ABO-Zugehörigkeit; dagegen sollte die Rh-Zugehörigkeit (D) des Empfängers wegen einer Sensibilisierungsgefährdung durch mittransfundierte Erythrozyten immer berücksichtigt werden.

Die untenstehende Tabelle 8 gibt die Stoffwechselleistung der Thrombozyten wieder:

Tabelle 8

Stoffwechselleistungen der Thrombozyten

Mikromol/10^{11} Plättchen, 37°C, pH 7,4;
Bikarbonat Ringer-Lösung 0,1 M Glukose;
95% O_2 - 5% CO_2

	u mol
O_2-Aufnahme/h	86,3 ± 18,1
CO_2-Bildung/h	95,7 ± 25,5
Pyruvatbildung/h	3,9 ± 1,0
Lactatbildung/h	76,4 ± 28,6
Glucoseverbrauch/h	74,8 ± 16,7
ATP	21,5 ± 5,4
ADP	6,9 ± 2,6
AMP	8,1 ± 3,0
Glykogen	27,2 ± 8,0

Eingefrorene mit Glyzerin vorbehandelte Thrombozyten zeigen nach dem Auftauen einen in vivo-Recovery-Abfall nach 3 Tagen von 30 auf 20%, die mit DMSO behandelten einen Abfall von 20 auf 10%.

2.1.3. Die Leukozyten

Ein Mikroliter Blut enthält normalerweise 4.000 bis 8.000 weiße Blutkörperchen (Leukozyten). Davon fallen auf die segmentkernigen neutrophilen Grynulozyten 60 bis 75%, deren Durchmesser 13 bis 15 µ beträgt und deren spezifisches Gewicht bei 1,087 bis 1,092 liegt. Der übrige Anteil der Leukozyten verteilt sich wie folgt:

Lymphozyten 25%
Monozyten 5%
Eosinophile 1,5% und
Basophile 0,5%
Das spezifische Gewicht der Lymphozyten beträgt 1,070. Etwa 95% der Gesamt-Granulozytenmenge (ca. $1,2 \times 10^{12}$ Zellen) finden sich im Knochenmark als Vorstufen, 5% verteilen sich im Blut als sog. zirkulierender Pool und in den blutreichen parenchymatösen Organen als sog. marginaler Pool. Dieser sog. totale periphere Granulozytenpool enthält im Mittel 3 bis 6×10^{10} Granulozyten. Die Halbwertszeit der Granulozyten beträgt je nach verwendetem Isotop zwischen 5 und 16 Stunden, so daß der tägliche Umsatz bei 0,5 bis $1,0 \times 10^{11}$ Granulozyten liegt. Dieser kann bei schweren Infektionskrankheiten (Septikämie, Sepsis) bis um das Zwanzigfache höher liegen. Die physiologische Aufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht in der Phagozytose von Fremdkörpern.

Tabelle 9

GRANULOZYTENKINETIK		
Granulozytenzahl im KM		124-235 x 10^8/kg KG
Durchgang-Proliferationskompartment		7 Tage
Durchgang-Reifungskompartment		4 - 5 Tage
Granulozytenabgabe aus KM/24 Std.		16,3 x 10^8/kg KG
totaler peripherer	Granulozyten-Pool	7,0 x 10^8 kg/kg
	zirkulierender Pool	3,1 x 10^8/kg KG
	marginaler Pool	3,9 x 10^8/kg KG
	Normalbereich	4000 - 8000/µl
	Lebenszeiz	10 Std.
	Umsatz/24 Std.	12 x 10^{10}
	Abbauort	Interstitium, Lunge

nach QUEISSER

2.2. Indikationen zur Thrombozyten- und Granulozytentransfusion

Die Indikation zur Thrombozytentransfusion sollte stets nach besonders sorgfältigen Abwägungen gestellt werden. Einheitlich wird in der Literatur darauf hingewiesen, daß gerade Transfusionen von randomisierten Thrombozyten einen sehr hohen Stellenwert in der Sensibilisierungsgefährdung der Patienten haben. Eine voreilige und nicht unbedingt notwendige Thrombozytentransfusion führt sehr häufig zur Bildung von polispezifischen Antikörpern innerhalb des HLA-Systems, die jede weitere Transfusion von nicht HLA-identen Thrombozyten zur klinischen Ineffektivität verurteilen.

Die einzige vertretbare Indikation zur Thrombozytentransfusion ist bei sonst unstillbaren Blutungen und bei der drohenden Gefahr einer Gehirnblutung gegeben.

Für eine intakte in vivo-Funktion sprechen einmal das Sistieren der Blutungen, zum anderen ein Thrombozytenanstieg im peripheren Blut bei ausreichender Substitution bzw. klinisch wirksamen Dosierungen, welche bei 4 bis 10 x 10^{11} Thrombozyten liegen.

Die Indikation zur Granulozytentransfusion wird im allgemeinen bei Vorliegen einer Granulozytopenie ($< 200/\mu l$) und bakterieller Sepsis bzw. schwerer Infektion gestellt. Für eine intakte in vivo-Funktion der transfundierten Granulozyten spricht das Abheilen der Schleimhautulcera, dem Rückgang des Fiebers bzw. der Rückbildung der Infektion bei klinisch wirksamen Dosen von 4 bis 8 x 10^{10} Granulozyten/Tag.

2.3. Herstellung von Blutbestandteilpräparationen

Zur Gewinnung, d.h. Trennung der einzelnen Blutzellkomponenten (vorwiegend Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten) kommen aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Gewichte (s. Tabelle), vornehmlich Zentrifugationsmethoden zur Anwendung.

Tabelle 10

	Erythrozyten	Granulozyten	Lymphozyten	Thrombozyten
spez. Gewicht	1,095	1,090	1,070	1,040
Halbwert- bzw. Überlebenszeit	120 d (Überlebensz.)	5-16 h (Halbwertsz.)		7-10 d (Überlebensz.)

Das spezifische Gewicht des Plasmas beträgt ca. 1,027.

Die korpuskulären Bestandteile des Blutes zeigen unterschiedliche spezifische Gewichte auf (s. Tabelle 10). Aufgrund dieser physikalischen Unterschiede ist durch Sedimentation bzw. Zentrifugation eine Trennung der einzelnen Bestandteile möglich.

Für die Separationstechnik ist, wie Tabelle 11 zeigt, auch die Dauer der Separationszeit insbesondere bei Herstellung von Granulozytenkonzentraten aufgrund der kurzen Überlebenszeit dieser Zellelemente von entscheidender Bedeutung.

Tabelle 11

ÜBERLEBENSZEIT IN VITRO

	Erythrozyten	Granulozyten	Thrombozyten
Lagerungszeit	35 d	entfällt	72 d
recovery	> 70%	sofortige Transfusion > 50%	> 20%

Neben den einzelnen Zentrifugationsmethoden zur Komponententrennung finden sich noch die Sedimentation, die Filtration und die Zellelektrophorese ihre Anwendung.

Beschreibung der verschiedenen Zentrifugationsmethoden zur Zellkomponententrennung:

2.3.1. Die Gravitationsleukapherese (GL)

Bei dieser Methode, welche 1977 von DJERASSI zur Leukozytengewinnung entwickelt wurde, wird dem mit Steroiden (nur bei Leukapherese) konditionierten Spender nacheinander 6 Bluteinheiten (sog. Sechsfachbeutelpherese) entnommen, wobei nach entsprechender Aufbereitung dem Spender vor jeder weiteren Blutentnahme thrombozytenhaltiges Plasma und Erythrozyten retransfundiert werden. Die Aufbereitung geschieht durch zwei Fraktionierungsschritte, indem sich an eine Zentrifugation (3' bei 650 x g) der Blutkonserve - Trennung in PRP und buffy-coat-haltigem Erythrozytenkonzentrat - die ca. 15 Min. dauernde Sedimentation z.B. mit 500 ml 3%igem HÄS vermischten buffy-coat-haltigem Erythrozytenkonzentrates anschließt. Mit dieser Methode können ungefähr 2×10^{10} Leukozyten bzw. $1,5 \times 10^{10}$ Granulozyten separiert werden.

Im allgemeinen sollte eine Einheit PRP (=Platelet Rich Plasma) (220 ml Plasma) gewonnen aus 450 ml Frischblut 70%, das sind $0,7 \times 10^{11}$ Thrombozyten, eine Einheit PC (=Platelet Concentrat) $0,5 \times 10^{11}$ Plättchen enthalten, wenn man von einer Gesamtthrombozytenzahl von 225.000 - 7.500/ul, das sind $1,0 - 0,3 \times 10^{11}$ Plättchen/450 ml Frischblut, ausgeht. Die Erythrozytenbeimengung sollte nicht mehr als 5×10^{9} Zellen/Einheit betragen und der Lagerungs-pH bei 6,5 liegen, wobei Änderungen des

pH-Wertes mit der Lebensfähigkeit der Thrombozyten korrelieren; je saurer das Milieu, desto kürzer die Überlebenszeit.

Die Vorteile der Gravitationsleukapherese liegen in einer befriedigenden Granulozytenzahl bei Substitutionsanwendung im Kindesalter. Die Zellseparation selbst ist gegebenermaßen risikoärmer als mit den teuren automatischen Zellseparatoren (IBM, AMINCO etc.)

Die Nachteile liegen in der Konditionierung des Spenders, der Verwendung von Sedimentationsbeschleunigern, den geringen Granulozytenerträgen bei relativ hohen Plasma- und Erythrozytenverlusten (es sind maximal 3 GL möglich), sowie in den hohen Materialkosten.

Dieses allgemeine Schema kann wie folgt modifiziert werden:

I) Verwendung von 2-fach Beutel:
   1) eine Blutspende von 400 - 500 ml läßt man spontan sedimentieren. Dieses Verfahren kann
      a) zur Herstellung eines PRP (indem dieses in den Transferbeutel geleitet wird) dienen

   2) eine Bluteinheit wird
      a) zur Herstellung eines PRP 3 - 10' bei ca. 700 g zentrifugiert

b) zur Herstellung eines Plättchenkonzentrates (PC) nochmalige Zentrifugation 20' bei 3000 g. Das Plasma kann in einen Transferbeutel zur weiteren Verarbeitung (FFP, Albumine, etc.) geleitet werden.

II) Verwendung von 3-fach-Beuteln:

1) wie I 1a und anschließende Zentrifugation 20' bei 3000 g zur Herstellung von PC

2) wie I 2a und anschließende Zentrifugation 20' bei 3000 g zur Herstellung von FFP und PC

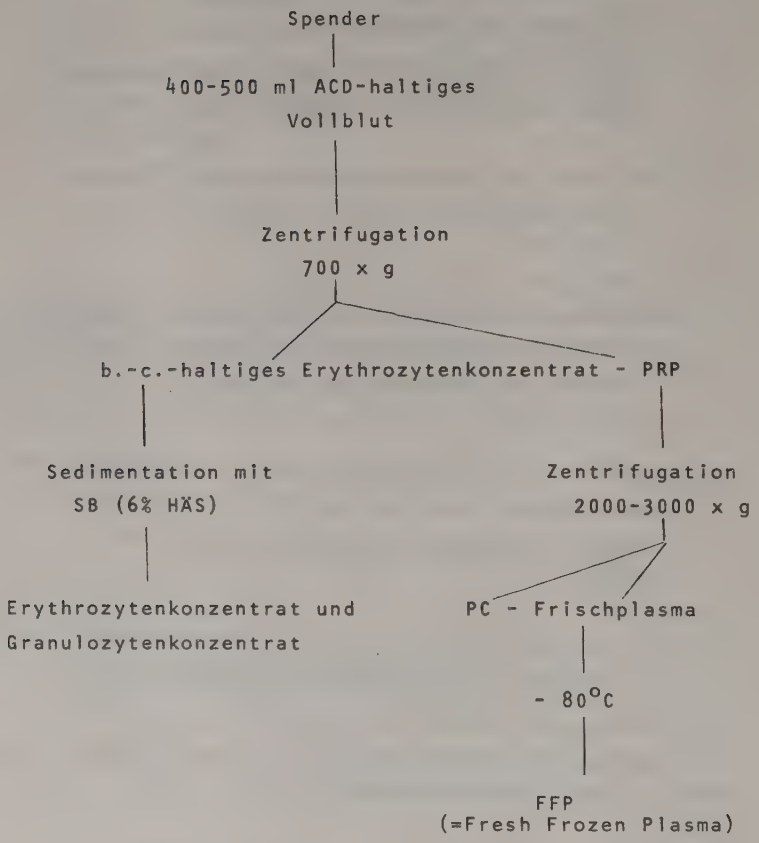
3) wie I 2a und anschließender Zentrifugation und/oder Sedimentation mit SB zur Herstellung von Granulozytenkonzentraten

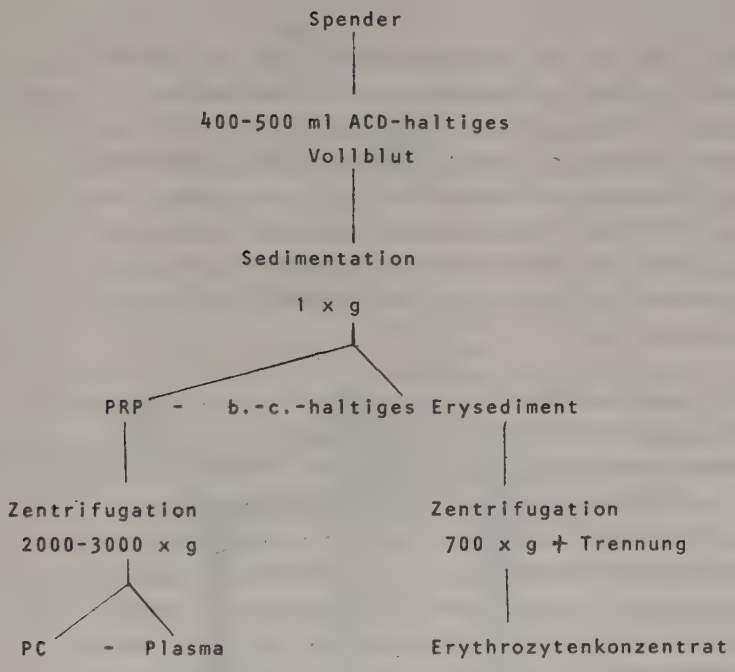
III) Sollen mehrere Bluteinheiten eines Spenders nacheinander verarbeitet werden, so können folgende Fraktionierungswege beschritten werden:

1) Zur Gewinnung von PC: IIa, Retransfusion von Plasma und b.-c.-haltigem Erykonzentrat

2) Zur Gewinnung von GC: II 3, Retransfusion von PRP und Erythrozyten

Schemata zur Gewinnung der einzelnen Blutkomponenten aus einer gespendeten Blutkonserve:



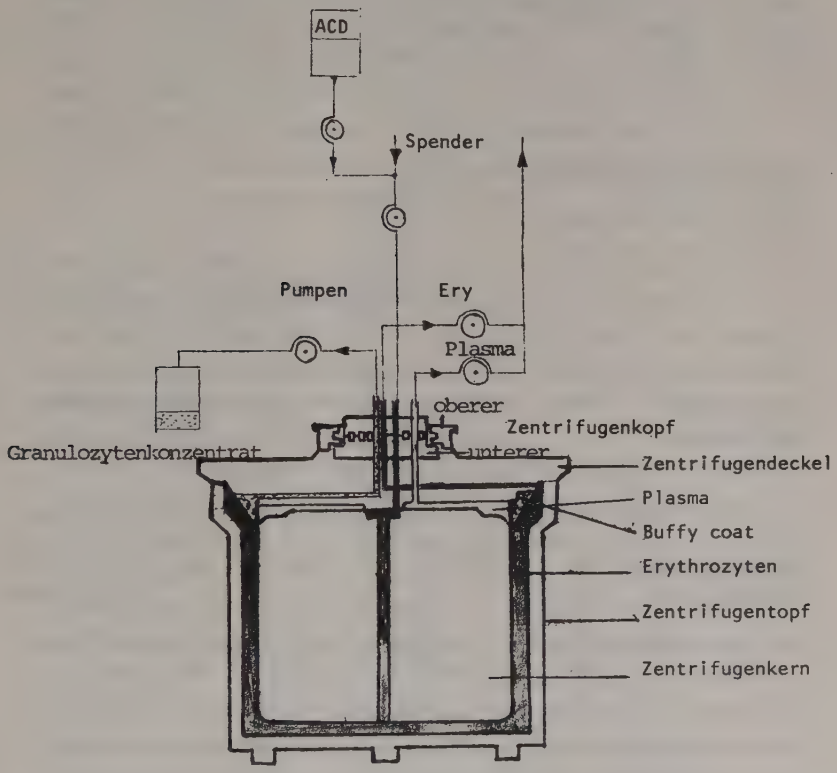

Spender
400-500 ml ACD-haltiges
Vollblut
Sedimentation
1 x g
PRP - b.-c.-haltiges Erysediment
Zentrifugation
2000-3000 x g
Zentrifugation
700 x g + Trennung
PC - Plasma
Erythrozytenkonzentrat

2.3.2. Die kontinuierliche Zellseparationsmethode oder die sog. Continuous-Flow-Centrifugation (CFC)

1977 wurde von der IBM-Corporation auf der Grundlage eines 1964/65 in Zusammenarbeit mit FREIREICH, JUDSON u. Mitarb. entwickelte kontinuierlich arbeitenden Blutzellseparators (zur Leukozytengewinnung) ein Zellseparator konzipiert, der neben hohen Granulozytenerträgen auch Granulozytenkonzentrate unter Verwendung von Sedimentationsbeschleunigern und Steroiden (Steigerung der Extraktionseffektivität) bereitstellte.

Nach demselben CFC-Prinzip arbeitet auch der AMINCO-Zellseparator. Hierbei wird durch Punktion beider Kubitalvenen ein extrakorporaler Kreislauf, dem der Zellseparator zwischengeschaltet ist, geschaffen, wobei das zum Separator fließende venöse Blut (30 bis 80 ml/min) antikoaguliert ist (ACD-Lösung, Heparin). Aufgrund der verschiedenen Zelldichte bzw. spezifischen Gewichte werden im Separationskanal zwischen Zentrifugentopf und Zentrifugenkern bei ca. 100 x g Erythrozyten-bc-Schicht-Plasma getrennt, über radiale Kanälchen im Zentrifugendeckel abgesaugt, wobei Erythrozyten und Plasma hinter den Rollerpumpen wieder vereinigt und dem Spender über die Vene des anderen Armes zurückgegeben wird. Hierbei beträgt das extrakorporalen Blutvolumen ca. 230 ml. Durch Regulierung des Blutflow, des Hämatokritwertes, der Umdrehungszahl

der Zentrifuge und der Geschwindigkeit der Absaugpumpen für Erythrozyten und Plasma läßt sich die bc-Schicht an einer bestimmten Stelle stabilisieren,



Prinzip der kontinuierlichen Zentrifugationsmethode

an der diese kontinuierlich abgesaugt wird. Die Kontamination des Granulozytenkonzentrates mit Thrombozyten (abhängig von der g-Zahl) kann bis $6,5 \times 10^{11}$ Zellen, mit Lymphozyten bis zu $1,0 \times 10^{10}$ Zellen liegen. Der Hb-Abfall liegt im Mittel bei 1,7 g%.

GRANULOZYTENGEWINNUNG DURCH KONTINUIERLICHE ZELLSEPARATION (CFC) n.G. ECKERT

Granulozyten anreicherung	Dauer	Gesamtausbeute	Ausbeute/l durchfließender Blutmenge	Zell-funkt.	Antikoagulation
Spenderkonditionierung u. SB	3-7 Stdn	$1\text{-}6 \times 10^{10}$	$0,2\text{-}0,4 \times 10^{10}$	gut	0,03-0,04 ml ACD/ml Blut
keine	3-7 Stdn	$0,5\text{-}3 \times 10^{10}$	$0,1\text{-}0,2 \times 10^{10}$	gut	dito

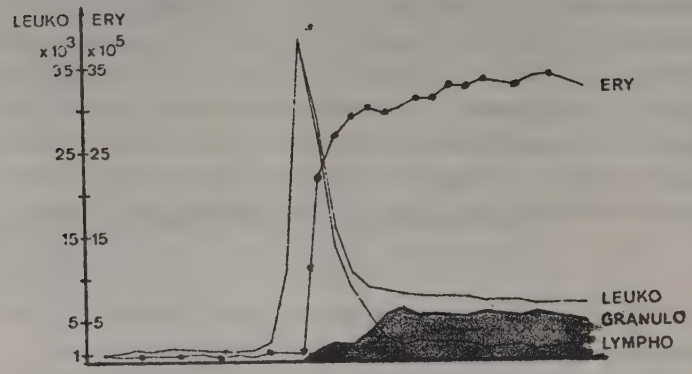
Die Vorteile dieser Methode liegen in einem geringen Erythrozyten- und Plasmaverlust bei hoher Granulozytenausbeute, die Nachteile in der Anwendung von Corticoiden

und Sedimentationsbeschleunigern (6%iges HÄS im Verhältnis 1 : 10-12), des hohen extrakorporalen Blutvolumens (7- 10 l), Parästhesien als Zeichen einer Hypokalzämie (in 20% der Fälle), der möglichen Luftembolie und der Venenpunktion beider Arme, der hohen Anschaffungskosten und zeitraubenden Reinigungsarbeiten (z.Z. 1 x Systeme). Der Hämoglobinverlust beträgt je nach Erythrozytenkontamination bis zu 20% des Ausgangswertes bei 3 - 7 Spenden. Nach 3 Spenden konnte ein Gesamteiweißverlust von bis 20% festgestellt werden.

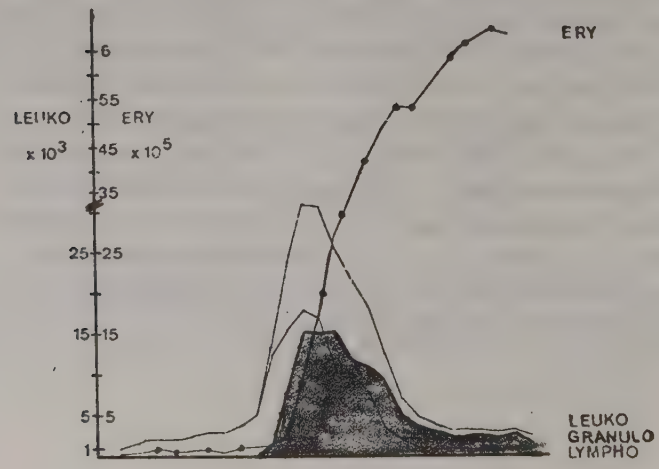
Die untenstehende Abbildung gibt die Trennprofile der kontinuierlichen Zellseparation (FC) ohne und mit Sedimentationsbeschleuniger dar: Man erkennt eine deutliche Granulozytenanreicherung kurz nach Auftreten der buffy-coat-Schicht.

Zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten mit der CFC-Methode können zwei Wege beschritten werden. Zum einen können bei hohen Umdrehungszahlen (1200 -1500 Vpm) die Thrombozyten in der buffy-coat-Schicht angereichert werden und man erhält Konzentrate (kontaminiert mit Le-kozyten und Erythrozyten) mit Plättchenzahlen von $7 - 10 \times 10^{11}$. Zum anderen wird das bei geringen Umdrehungszahlen (600 - 800 Upm) erhaltene plättchenreiche Plasma, welches kaum Erythrozyten und Leukozyten enthält bei 2600 g zu einem Thrombozytenkonzentrat weiterverarbeitet; hier werden Plättchenzahlen von annähernd 10^{12} erreicht (5l Plasma).

Trennprofil der CFC-Separation nach BORBERG

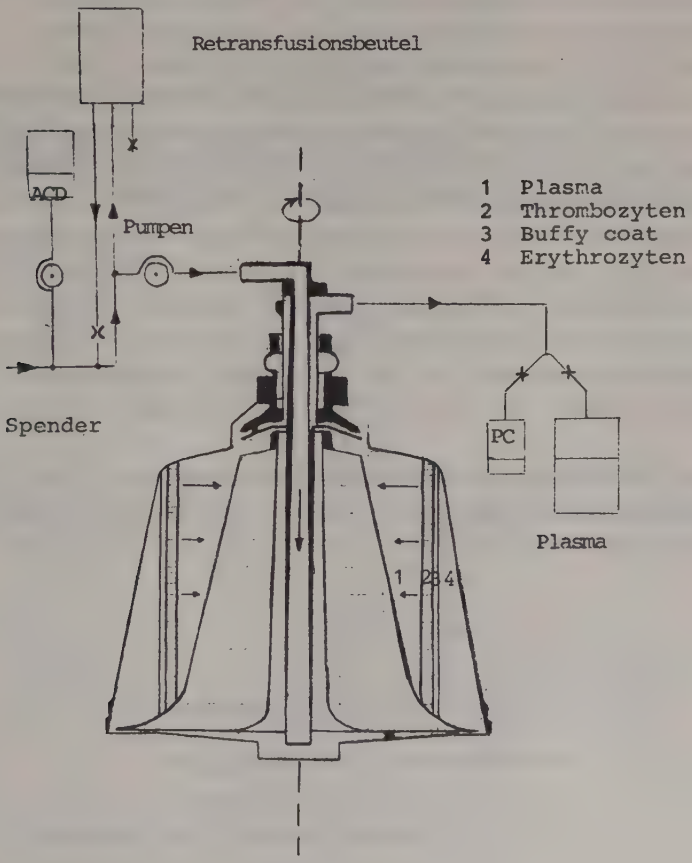


Trennprofil der CFC-Separation mit Sedimentationsbeschleuniger



2.3.3. Die intermittierende Zellseparationsmethode oder die sog. Intermittend-Flow-Centrifugation (IFC)

Der Zellseparator Hämonetics Model 30 wurde von LATHAM vorwiegend zur Thrombozytengewinnung entwickelt. Nach Einführung der Spenderkonditionierung in Kombination mit SB eignet sich dieser Zellseparator auch zur Herstellung von Granulozytenkonzentraten.



Wie die Abbildung zeigt, gelangt das antikoagulierte Spenderblut über eine Rollerpumpe (20 - 100 ml/min) in einen rotierenden Zentrifugationsbehälter (4.800 Upm), der sog. Bowl (mit drei verschiedenen Volumina: 125 ml, 225 ml und 375 ml) und wird in einer dargestellten Weise separiert: das spezifisch leichtere Plasma wird zuerst in einem Behälter aufgefangen, durch Ventilumstellung wird dann das Thrombozytenkonzentrat in einem zweiten Beutel gesammelt, in einem dritten schließlich wird bei Verwendung von Steroiden zur Spenderkonditionierung und 500 ml 6% HÄS als Sedimentationsbeschleuniger das Granulozytenkonzentrat aufgehoben. Durch Schließen der Ventile an Beutel 1 und 2 und Pumpenumkehr gelangt das Plasma in die mit Erythrozyten gefüllte Glocke zurück und wird mit diesem in einen höhergelegenen Retransfusionsbeutel gepumpt. Bei mit isotoner NaCl-Lösung gefülltem Einmalsystem kann jetzt durch Zwischenschalten eines Blutanwärmers entweder an dieselbe Vene oder an eine zweite retransfundiert werden. Im allgemeinen werden 4-8 solcher Durchgänge zur Erlangung klinisch wirksamer Plättchenzellen, dies entspricht einem verarbeiten extrakorporalem Blutvolumen von bis zu 6 l bei Verwendung der 375 ml Bowl, bis zu 4 l für die 225 ml Bowl, durchgeführt.

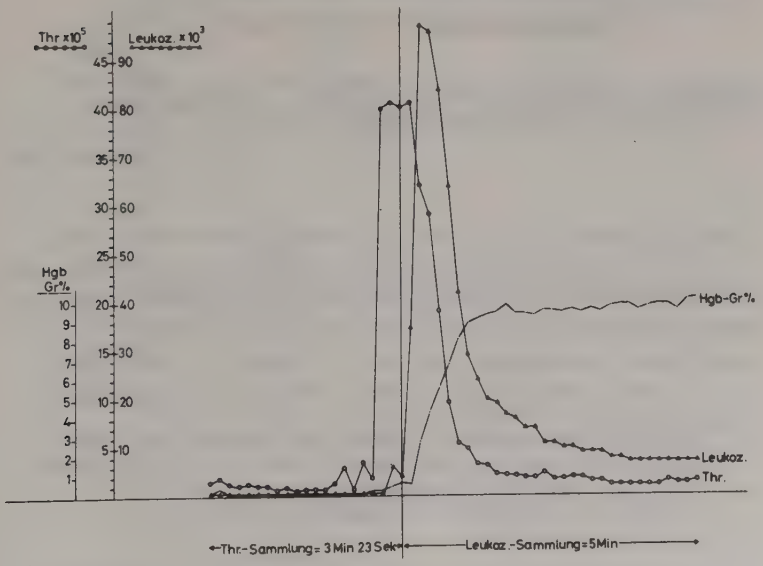
Das Verhältnis des zugeführten Antikoagolums (1,8% ACD-B bzw. 3% ACD-A-Lösung) erfolgt wie bei der CFC-Methode im Verhältnis 1:8.

Bei Verwendung von 500 ml 6% HÄS mit der entsprechenden Menge Na-Citrat und Dexamethason lassen sich Granulozytenerträge von 2 x 10^{10} Zellen erzielen.

Um die Extraktionseffizienz zu erhöhen, empfiehlt es sich, den Spender-flow auf 10-20 ml/min zu drosseln und bis zu 150 ml Blut vom Auftreten der sog. pink-Färbung (=buffy-coat und erste Erythrozytenbeimengung) an pro Lauf zu sammeln und anschließend eine 20 minütige GL anzuschließen, um dem Spender die Erythrozyten retransfundieren zu können.

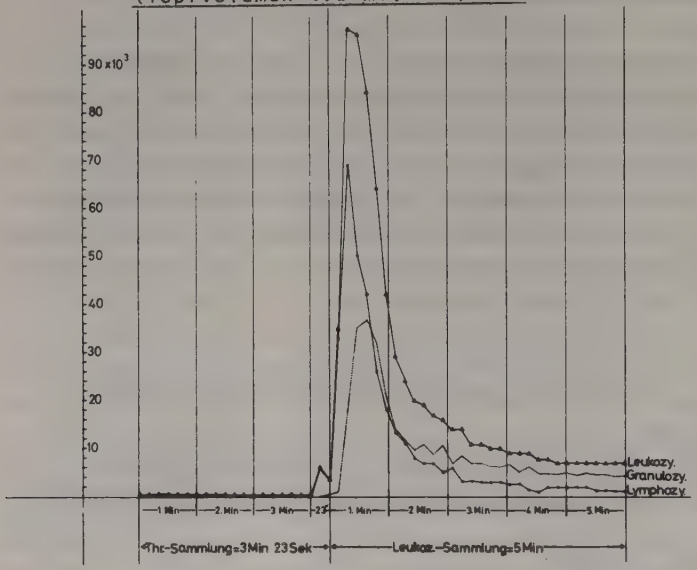
Die untenstehende Abbildung zeigt das Trennprofil mit SB:

Model 30. Leukozyten- und Thrombozytenverteilung pro Zyklus (Topfvolumen=375 ml, HÄS/Zitrat)



Trennprofil des Haemonetics Blood Processor Model 30 - Leukozyten- und Thrombozytenveretilung

Model 30: Leukozytenpräparation - Granulozyten- und Leukozytenverteilung
(Topfvolumen=375 ml. HÄS/Zitrat



Trennprofil des Haemonetics Blood Processor Model 30. Granulozyten- und Lymphozytenverteilung

Die Thrombozytenausbeute liegt bei Verwendung der 225 ml-Bowl bei 8 Durchgängen und somit einem verarbeiteten Blutvolumen von ca. 4 l bei 40 - 80%* $\hat{=}$ 4 - 8 x 10^{11} Thrombozyten/100 ml Plasma; bei Verwendung

* Eine 80%ige Ausbeute erhält man jedoch nur, wenn bis tief in die Erythrozytenphase hinein gesammelt wird, so daß dem Thrombozytenkonzentrat 100 ml gepackte Erythrozyten beigemengt sind.

der 375 ml-Bowl bei 60 bis 70%). Gesammelt wurde bei einem Spendeflow von 10 bis 15 ml/min bis kurz vor dem Auftreten der sog. Pinkfärbung. Eine höhere Ausbeute läßt sich erzielen, indem ab Pinkfärbung. weiter 25 ml/Lauf in einem zweiten Beutel gesammelt werden und das Gesamtvolumen anschließend bei 800 Upm 7' lang zentrifugiert, das plättchenreiche Plasma dem ersten Beutel zugeführt und der Rest (Leukozyten und Erythrozyten) dem Spender zurückgegeben wurde.

Die Lymphozytenbeimengung ist bei der IFC erheblich, sie beträgt ca. 90% und liegt damit (wegen der höheren Umdrehungszahl) über der der CFC-Methode.

Eine Bestrahlung dieserart gewonnenen Thrombozytenkonzentrate ist aufgrund einer möglichen GVH-Reaktion gegeben.

2.4. BIOCHEMISCHE MÖGLICHKEITEN ZUR VERMEHRTEN GEWINNUNG VON GRANULOZYTEN:

1. Durch Pseudoagglutination der Erythrozyten wirken Hydroyäthylstärke (HÄS), hochmolekulare Dextrane und Gelatine sedimentationsbeschleunigend, so daß es zu

einer ungefähren Verdoppelung der Granulozyten in der Schicht kommt. Die optimale Konzentration soll bei einem SB/Vollblutverhältnis von 1 : 8 liegen.

2. Die Konditionierung mit Corticoiden bewirkt eine Ausschwemmung von Granulozyten aus dem Marginalpool, während in der Separationsphase aus dem Knochenmark 0,7 bis 2,4 x 10^{10} Granulozyten ausgeschüttet werden, so daß insgesamt 3,5 bis 7,5 x 10^{10} Granulozyten während der Separation zur Verfügung stehen. Der Extraktionskoeffizient also ohne Konditionierung aber annähernd 30% beträgt, das sind 1,1 bis 2,2 x 10^{10} Granulozyten, mit Konditinonierung dagegen die Steigerungsrate bei 30 bis 340% liegt.

Die Dosierungen für die verschiedenen intravenös injizierten Corticoide bis zu 3 Stunden vor der Spende liegen bei:

Stimulanz	Menge	Effekt nach	
Ätiocholanolon	4 mg/m^2 KOF	8 - 14 (12-18)	Stdn
Dexamethason	2 x 3 - 6 mg	4 - 8	
Hydrocortison	100 - 375 mg	4 - 8	Stdn
Prednisolon	40 - 250 mg	4 - 8	
Prednison	50 - 200 mg	4 - 8	

3. Ergebnisse eigener Modifikationen der intermittierenden Thrombozytopherese.
Überlegungen, Erfahrungen und Vorschläge

Die hier beschriebenen Methoden zur Gewinnung von klinisch wirksamen Thrombo- bzw. Granulozytenkonzentraten mittels speziell entwickelter Zellseparationszentrifugen weisen quantitative Ergebnisse auf, die, wie aus der Literatur ersichtlich, sehr unterschiedlich sein können. Die von den einzelnen Herstellerfirmen angebotenen Protokolle sind unseres Erachtens nicht so optimiert, daß sie erlaubten, überall die gleichen reproduzierbaren bestmöglichen Ergebnisse zu gewinnen.

Wir haben uns insbesondere mit der Optimierung des Arbeitsprotokolls der Firma Haemonetics für das Modell Haemonetics 30 zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten befaßt und aufgrund eigener Vorstellungen und Erfahrungen wesentliche Verbesserungen in der Ausbeute erzielen können.

Der Einsatz von speziell entwickelten Zellseparationszentrifugen ist nur in wenigen, dafür besonders eingerichteten Zentren möglich. Selbst in besten apparativ ausgestatteten Zentren kann jedoch eine momentane Auslastung der vorhandenen Geräte zu Engpässen in der Versorgung führen. Die Thrombozytensubstitution ist jedoch eine therapeutische Maßnahme von so eminenter Bedeutung, daß angenommen werden muß, daß der Bedarf an Thrombozytenkonzentraten in absehbarer Zeit erheblich zunehmen wird. Wir haben uns Vorstellungen erarbeitet und erprobt, die erlauben, auch ohne die Anwendung von

speziellen Zentrifugen die Gewinnung von Thrombozyten- bzw. Granulozytenkonzentraten in therapeutisch wirksamer Konzentration zu ermöglichen.

3.1. Erfahrungen mit einem eigenen Verfahren der intermittierenden Thrombozytopherese zur Gewinnung von Thrombozyten- und Granulozytenkonzentraten

3.1.1. Benötigte Geräte und Methode

a) eine zur Zentrifugation von Vollblutbeuteln geeignete Zentrifuge (als besonders geeignet hat sich hier die von der Heraeus-Firma hergestellte Plasmafuge erwiesen, die eine vollständige Sedimentation der korpuskulären Blutbestandteile einschließlich des Bremsvorganges bis zum Stillstand in wenigen Minuten erlaubt)

b) Dreifachbeutelsysteme

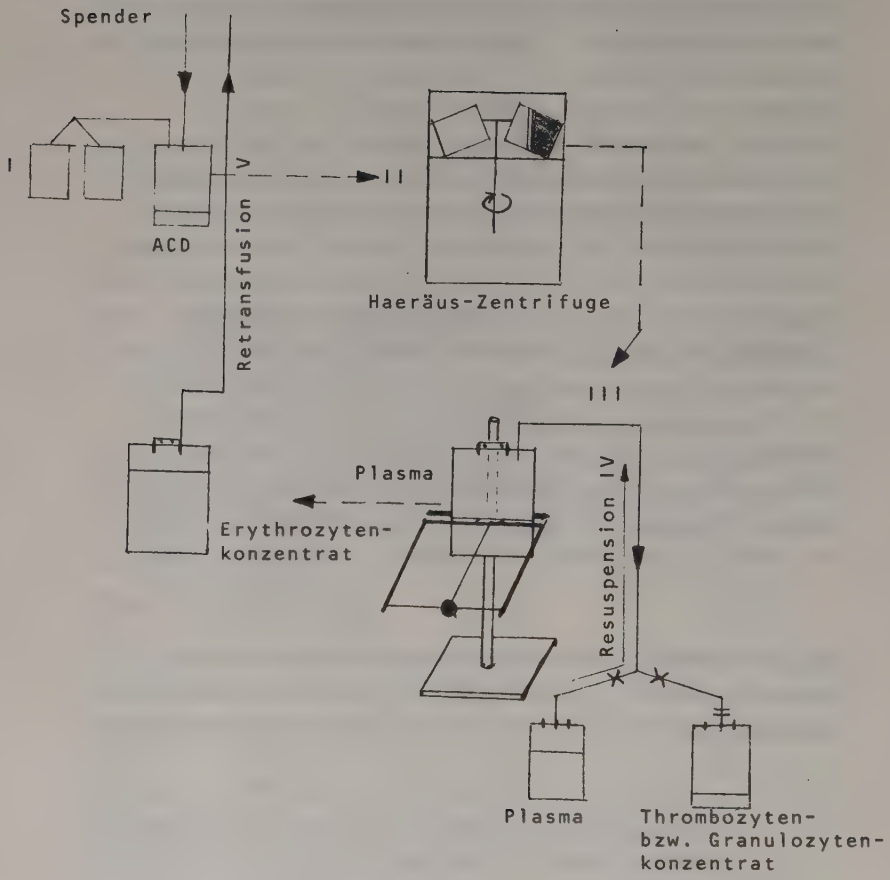
c) Trenngerät zur wirbelungsfreien Trennung der Blutkomponenten

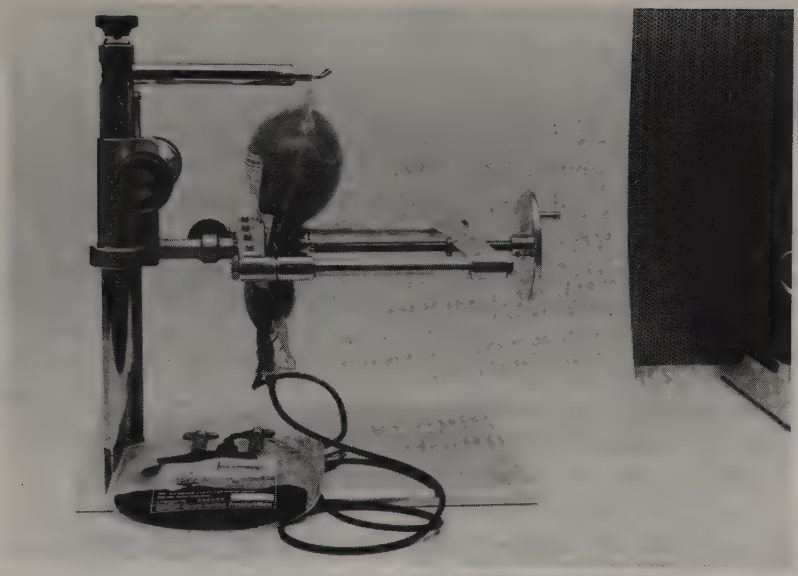
Dem Spender wird über eine Braunüle G 14 und einem Dreiwegehahn in einem Dreifachbeutel (1 normaler Blutspendebeutel mit ACD-Lösung und 2 Transferbeutel) 500 ml Blut entnommen (SCHRITT I). Nach Umstellung des

siehe Darstellung

Dreiweghahnes wird die Vene mit physiologischer Kochsalzlösung offengehalten und der nächste Dreifachbeutel angeschlossen. Das antikoagulierte Blut wird in der Heraeus-Plasmafuge 10' bei 6000 x g zentrifugiert (SCHRITT II) und anschließend mittels des von Professor SCHNEIDER am hiesigen Institut für Transfusionsmedizin speziell für buffy-coat-freie Erythrozytenkonzentrate entwickelten Trenngerätes (s. Abb.) direkt unterhalb der buffy-coat-Schicht verwirbelungsfrei getrennt (SCHRITT III). Das zellfreie überstehende Plasma wird in den ersten Transferbeutel und das Thrombozyten und Erythrozyten enthaltene Granulozytenkonzentrat in den zweiten Transferbeutel geleitet. Das Plasma wird den Erythrozyten wieder zugeführt, diese darin resuspendiert (SCHRITT IV) und dem Spender über einen Blutwärmer zurückgegeben (SCHRITT V). Dieser Vorgang wird insgesamt 4 x wiederholt, so daß ca. 2000 ml Frischblut in 3 Stunden verarbeitet werden.

Zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten wird dagegen zunächst 10' bei 3000 x g und anschließend das thrombozytenreiche Plasma 10' bei 5000 x g zentrifugiert.


Spender
I
ACD
V
Retransfusion
II
Haeräus-Zentrifuge
III
Plasma
Erythrozyten-
konzentrat
Resuspension IV
Plasma
Thrombozyten-
bzw. Granulozyten-
konzentrat



Beschreibung des abgebildeten Gerätes:
Die auf dem Kopf stehende zentrifugierte Vollblutkonserve (Zweifachbeutelsystem) wird vorsichtig in das Trenngerät gehängt und die auf zwei seitlichen Führungsstiften frei vor- und rückwärts mittels eines Schraubgewindes bewegliche Backe auf die hinter dem Blutbeutel feststehende Backe zugeführt. Unmittelbar vor Berührung der Backe mit der Konserve werden beide Backen auf buffy-coat-Höhe eingestellt. Duch Weiterführen des mit der Backe starr verbundenen Gewindes wird die Blutkonserve verwirbelungsfrei in ein kaum Leukozyten enthatenes Erythrozytenkonzentrat und in ein Erythrozyten-Leukozyten- und thrombozytenhaltiges Plasma getrennt. Das Erythrozytenkonzentrat kann jetzt in den Transferbeutel geleitet werden und danach abgetrennt werden. - Wird eine aufrecht stehend zentrifugierte Blutkonserve in das Trenngerät gehängt, kann man wie oben beschrieben bei gleichem Vorgehen Thrombozyten- bzw. Granulozytenkonzentrat gewinnen.

3.1.2. Ergebnisse

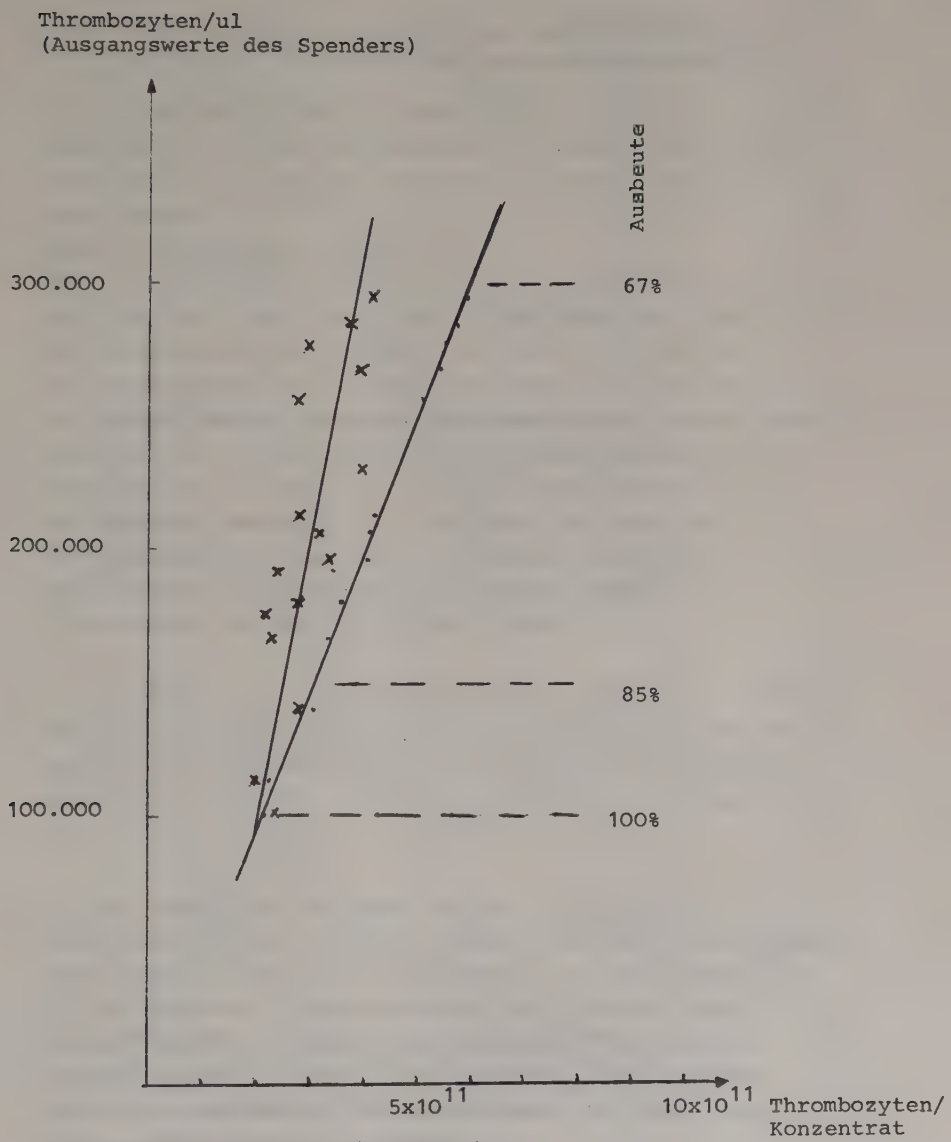
Die mittlere Thrombozytenausbeute bei einer Probandenzahl N = 16 betrug 73% - das entspricht 3×10^{11} Plättchen - bei einem Plasmavolumen von 320 ml (s. Abb.). Der Erythrozytenverlust betrug im Mittel 65 ml, so daß diese Art der Blutkomponentenspende 3-4mal wiederholt werden kann. Nebenreaktionen beim Spender (wie Citrateffekt, hypovolämische, etc.) wurden nicht beobachtet.

Die Ausbeute der Leukozyten lag im Mittel bei $0{,}56 \times 10^{10}$ bei einem durchschnittlichen Leukozytenausgangswert von 6500/µl, die der Granulozyten lag im Mittel bei $0{,}5 \times 10^{10}$ Zellen, das sind 48% unter der Berücksichtigung, daß der Spender weder konditioniert war noch Sedimentationsbeschleuniger verwendet wurden (s. Abb.). Bei dieser Leukaphereseart konnten beim Spender regelmäßig ein 10-80%iger Granulozytenanstieg bis zum vierten Durchgang festgestellt werden (Ausgangs- und Endwertbestimmung beim Spender).

Siehe auch die tabellarischen und graphischen Darstellungen:

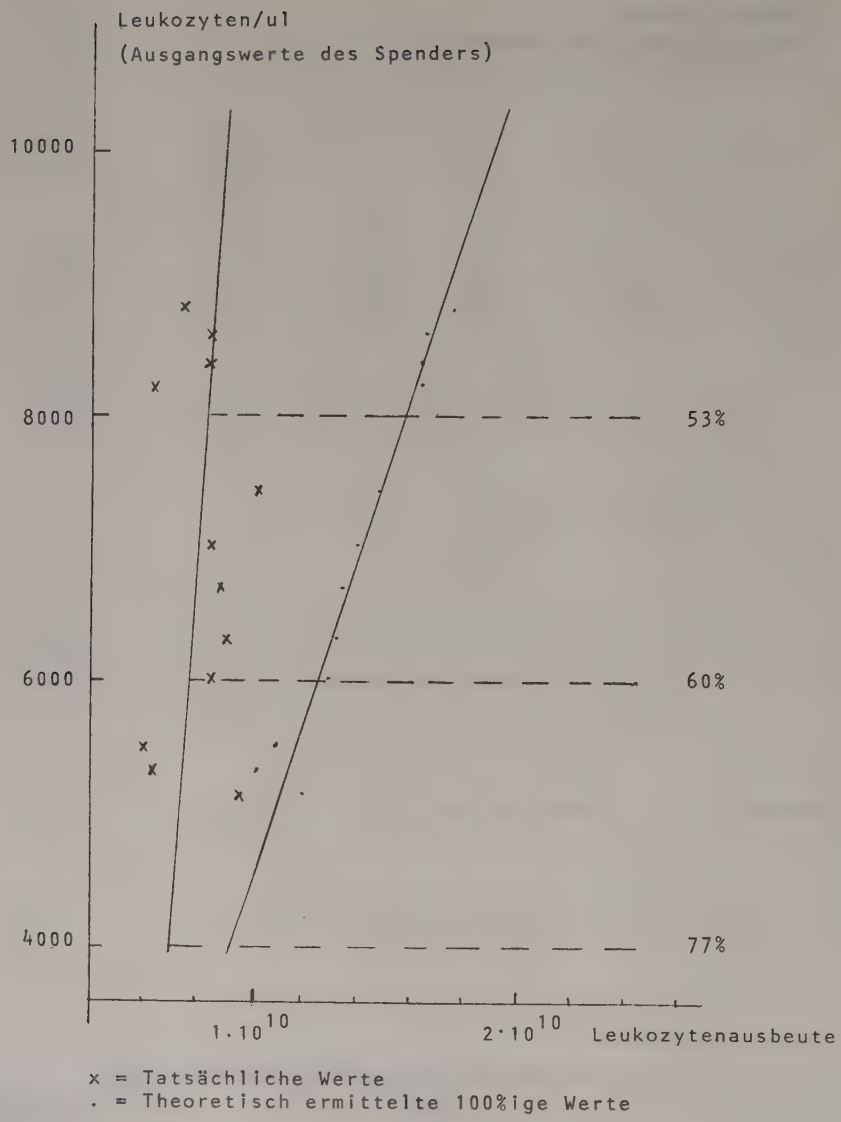
Verarbeitetes Spender-Gesamt-Volumen (ml)	Konzentrat-volumen (ml)	Thrombozyten Ausgangs- und Endwert des Spenders $_{(ul^{-1})}$	Theoretisch/ tatsächlich gewonnene Thrombozytenzahl $_{(x10^{11})}$	Erythrozyten-verlust $_{(x10^{12})}$
2100 ml	240 ml	100.000/82.000	2,1 / 2,4	0,64
1850 ml	370 ml	112.000/96.000	2,24/ 2,1	1,01
1960 ml	325 ml	140.000/121.000	2,8 / 3,2	0,79
2000 ml	250 ml	167.000/160.000	3,3 / 2,3	0,61
1820 ml	310 ml	175.000/169.000	3,4 / 2,2	0,75
2000 ml	290 ml	185.000/180.000	3,7 / 2,9	0,67
1810 ml	350 ml	191.000/187.000	3,45/ 2,4	0,91
2090 ml	320 ml	196.000/193.000	4,1 / 3,3	0,80
2000 ml	265 ml	206.000/200.000	4,1 / 3,2	0,57
2000 ml	370 ml	212.000/184.000	4,2 / 2,8	0,79
2600 ml	410 ml	230.000/205.000	6,1 / 4,0	1,10
2000 ml	280 ml	255.000/241.000	5,1 / 2,8	0,72
2030 ml	340 ml	266.000/239.000	5,4 / 4,0	0,83
2000 ml	360 ml	276.000/257.000	5,5 / 3,0	0,85
2000 ml	345 ml	284.000/260.000	5,7 / 3,8	0,80
2000 ml	340 ml	295.000/282.000	5,9 / 4,2	0,77

verarbeitetes Spender-Gesamt-Volumen (ml)	Konzentrat-volumen (ml)	Leukozyten Ausgangs- und Endwerte des Spenders $_{(ul^{-1})}$	Theoretisch/ tatsächlich gewonnene Leukozytenzahl $_{(x10^{10})}$	Verhältnis der Granulozyten zu Lymphozyten
1850	370	5150/9450	1,20 / 0,97	79 : 21
2100	240	5300/5560	1,03 / 0,64	87 : 13
2000	260	5500/7400	1,10 / 0,60	71 : 29
2180	320	6060/6700	1,30 / 0,86	76 : 24
2090	320	6300/9500	1,32 / 0,92	81 : 15
2000	340	6700/7900	1,35 / 0,90	82 : 18
2000	340	7000/8100	1,40 / 0,85	77 : 23
2000	290	7400/9500	1,48 / 1,03	75 : 25
2000	250	8200/8700	1,64 / 0,63	83 : 17
2020	310	8400/6700	1,64 / 0,84	78 : 22
1950	230	8600/9100	1,66 / 0,85	70 : 30
2000	270	8800/7900	1,76 / 0,75	75 : 25
1560	390	9900/8000	2,64 / 0,9	76 : 24



x = Tatsächliche Werte (Präparat)

. = Theoretisch ermittelte 100%ige Werte aus dem vorbereiteten Blutvolumen



x = Tatsächliche Werte
. = Theoretisch ermittelte 100%ige Werte

3.2. Modifikation der IFC mit dem Haemonetics model 30

Die im Abschnitt C beschriebene intermittierende Zellseparation (IFC) mit dem Haemonetics 30-Gerät zur Gewinnung von Thrombozyten wurde in folgender Weise modifiziert:

3.2.1. Methodik und Ergebnisse

Über eine Braunüle G 14 wird das Spenderblut mit einem Flow von 80 - 100 ml/min bis zur Bowl-Schulter, von der Glockenschulter ab mit einer Geschwindigkeit von 20 ml/min gesammelt und zentrifugiert. In dem Moment des Erkennens der geringsten Eintrübung des Plasmas wird der Flow wieder auf 80 - 100 ml/min gestellt und gleichzeitig die Taste zur Sammlung des Thrombozytenkonzentrates gedrückt. 10 - 15" nach Auftreten der sog. Pinkfärbung wird der Blutfluß unterbrochen und die Retransfusion kann beginnen. Es wurden insgesamt 4 Durchgänge mit der 375 ml Bowl gemacht.

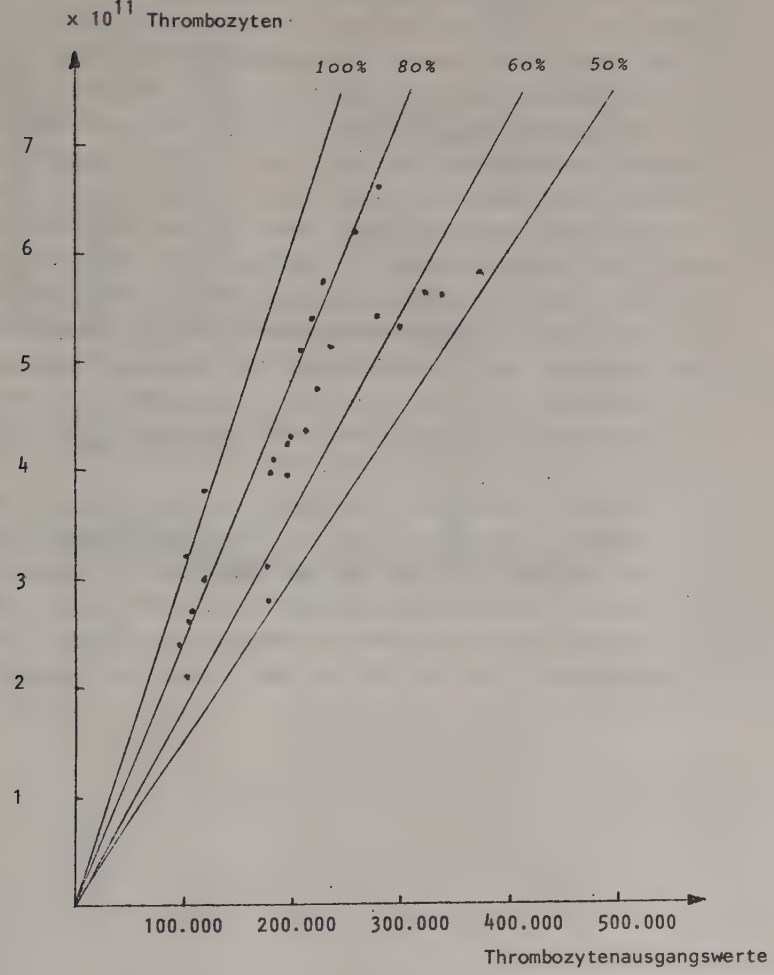
Bei einem mittleren Thrombozytenausgangswert von 205.000/ul konnten in einem Konzentrat (im Mittel 330 ml) im Mittel $4{,}3 \times 10^{11}$ Plättchen angereichert werden, das entspricht einer mittleren Ausbeute von 70% (s. Abb.).

Hierbei konnte nachgewiesen werden (s. Abb.), daß ein früherer Sammelbeginn ebenso wie ein zu früher Sammelstopp keine höheren Erträge liefert (was ja aus dem Trennprofil ersichtlich ist). Auf der anderen Seite konnte jedoch bei beiden intermittierenden Thrombopheresewerten gezeigt werden, daß bei gleichartigem Vorgehen, d.h. Entnahme gleicher Volumina/Lauf 100%ige Ausbeute nur bei Thrombozytenausgangswerten um 105.000 erlangt werden. Weiter

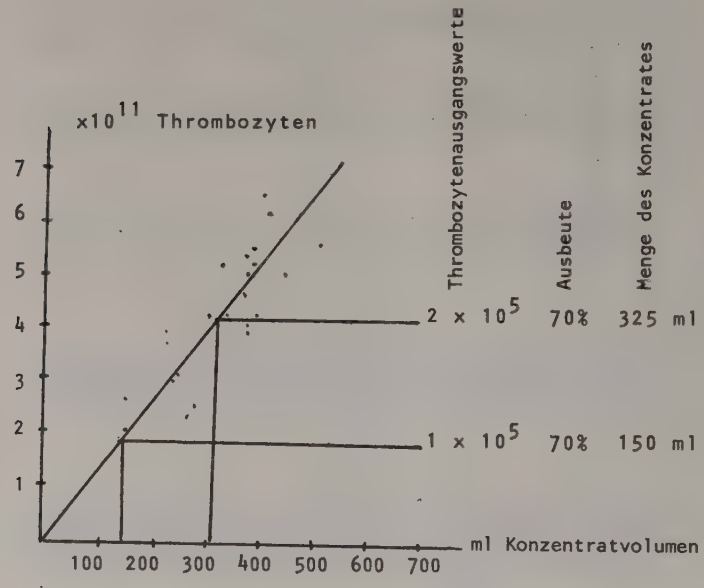
Thrombozyten-	Leukozyten-	Erythrozyten-	Thrombozyten-	Leukozyten-	Erythrozyten	Konzentrat-	Gesamtzahl der		
	Ausgangswerte/ul		Konzentratswerte/ul			volumen	Thrombozyten	Leukozyten	Erythrozyten
		($\times 10^6$)			($\times 10^6$)	(ml)	($\times 10^{11}$)	($\times 10^{10}$)	($\times 10^{12}$)
98000	4400	4,7	863000	14400	0,58	274	2,4	0,40	0,16
103000	6600	5,4	1292000	20200	0,98	246	3,2	0,50	0,24
103000	4600	5,2	1400000	24000	1,06	153	2,1	0,37	0,16
106000	7500	5,0	918000	19800	0,92	283	2,6	0,56	0,26
112000	5300	4,8	1729000	24900	0,79	155	2,7	0,39	0,12
117000	5000	4,8	1240000	19900	0,42	240	3,0	0,48	0,10
123000	7200	5,8	1642000	19000	2,15	230	3,8	0,44	0,50
165000	6500	5,1	1380000	16600	0,56	224	3,1	0,37	0,13
165000	7100	5,0	1050000	19700	0,76	266	2,8	0,52	0,20
178000	7000	5,5	1715000	32600	1,51	232	4,0	0,76	0,35
182000	4300	4,8	1075000	9800	1,45	380	4,1	0,37	0,55
195000	6400	5,5	1060000	16000	1,50	400	4,2	0,64	0,60
197000	6200	5,1	1052000	16100	1,16	376	4,0	0,61	0,44
200000	13100	5,5	1269000	33100	1,67	340	4,3	1,13	0,57
213000	6500	5,2	1127000	16500	0,37	450	5,1	0,74	0,17
214000	8400	4,8	1415000	27300	2,01	307	4,4	0,84	0,62
219000	7300	4,6	1376000	12300	1,13	388	5,3	0,48	0,44
228000	5200	5,2	1247000	15000	1,44	375	4,7	0,56	0,54
233000	6800	5,0	1121000	17600	2,00	510	5,7	0,90	1,02
237000	10200	4,9	1341000	25500	1,22	380	5,1	0,97	0,46
265000	4600	5,5	1482000	20000	1,33	420	6,2	0,84	0,56
278000	5000	4,4	1424000	17000	1,48	375	5,3	0,64	0,55
280000	9500	5,3	1638000	19500	1,48	405	6,6	0,79	0,60
302000	5100	5,1	1601000	21200	1,37	330	5,3	0,70	0,45
318000	6700	4,9	1317000	14700	1,94	427	5,6	0,63	0,83
336000	6000	5,1	1421000	12500	1,33	395	5,6	0,49	0,53
353000	10800	4,1	1773000	27500	1,47	327	5,8	0,90	0,48
385000	7900	5,2	1719000	19100	1,51	390	6,7	0,75	0,59

$2,5 \times 10^{12}$ Erythrozyten sind in einer Vollblutkonserve enthalten

Thrombozytenerträge der mittels des Zellseparators Haemonetics model 30 (4 Läufe mit der großen Bowl = 375 ml) bei einem mittleren extrakorporalen Volumen von 3000 ml gewonnenen Konzentrate:



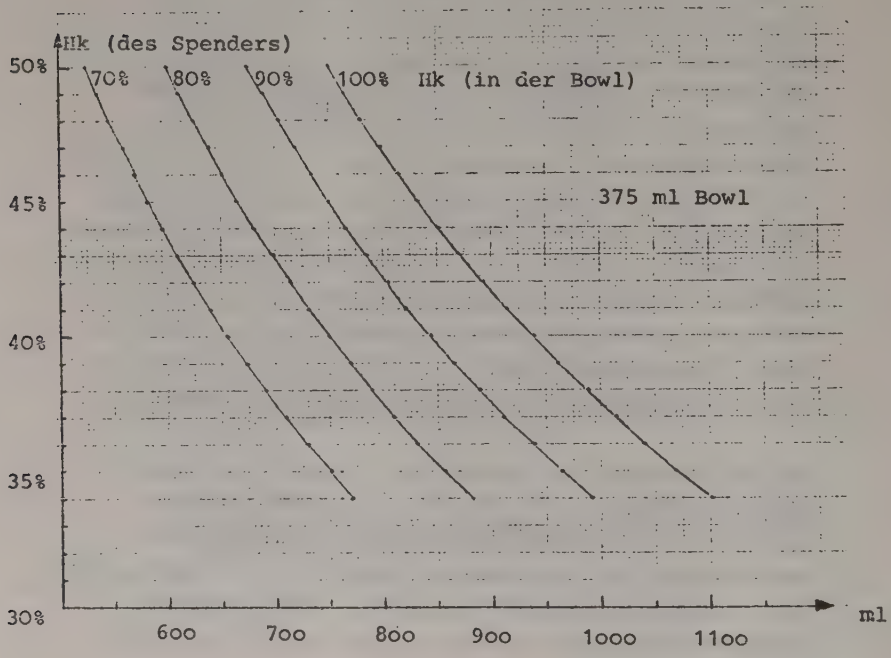
Ermittlung eines optimalen Thrombozytenkonzentrates in Abhängigkeit des entnommenen Konzentratvolumens bei vorgegebenem Spender-Thrombozytenausgangswertes und der oben angegebenen Sammeltechnik



konnte gezeigt werden, um höhere Ausbeuten zu erlangen, daß bei höheren Spenderthrombozytenausgangswerten ein höheres Konzentratvolumen erforderlich ist, wenn man nicht bei hohen Ausgangswerten den Spendeflow weiter reduziert, um längere Zentrifugationszeiten und somit ein niedrigeres Plasmavolumen zu erhalten. Es empfiehlt sich daher bei Verwendung der 375 ml Bowl neben der Bestimmung des Spenderhämatokrits zur Abschätzung des extrakorporalen Volumens (um unnötige Kreislaufbelastungen zu vermeiden) auch den Thrombozytenausgangswert zu bestimmen, um optimale Resultate bzw. Ausbeuten zu erhalten. Die Volumenangaben bei oben angegebener Technik ist für eine 70%ige Ausbeute an dem nachstehenden Diagramm ersichtlich. Die verschiedenen in der Literatur angegebenen Sammeltechniken können also noch optimiert werden. Ein überwiegender Teil der verbliebenen Thrombozyten konnte als Belag der Innenwand der Bowl nach Auswaschen derselben nachgewiesen werden.

Das tatsächliche extrakorporale Volumen ist abhängig vom Spenderhämatokrit, dem Hk in der Bowl (dieser wiederum ist abhängig von der Separationsdauer bzw. dem Spenderflow), und dem zurückgehaltenen Thrombozyten- bzw. Granulozytenkonzentratvolumen, wie folgendes Diagramm (berechnet für die 375 ml Bowl) veranschaulicht:

Diagramm zur Ermittlung des extrakorporalen Blutvolumens in Abhängigkeit vom Hämatokrit des Spenders und dem HK in der Bowl während der Gewinnung des Thrombozytenkonzentrats pro Lauf, wobei die Menge des gewonnenen Thrombo-



zytenkonzentrates nicht berücksichtigt ist, so daß sich also eine Rechtsverschiebung der obigen Kurve bei gegebenem Hk ergibt.

Folgendes Beispiel soll bei Verwendung der 375 ml-Bowl das extrakorporale Blutvolumen pro Lauf aufzeigen, wobei ein Hk-Abfall während jedes weiteren Laufes beobachtet wird und zu berücksichtigen ist:

Größe der Bowl: 375 ml

Hämatokrit des Spenders: Hk = 40%

Hämatokrit in der Bowl vor dem Zurückpumpen in den Retransfusionsbeutel: 85%

Zurückbehaltenes (flow-abhängig) Plasmavolumen, in welchem die Thrombozyten suspendiert sind: 50 ml

Extrakorporales Blutvolumen/Lauf: 790 + 50 ml = 840 ml

Retransfundiertes Volumen: 790 ml + 90 ml ACD-Lösung = 880 ml

(abzüglich des im System verbleibenden Volumen, wenn nicht mit NaCl-Lösung gespült wird).

4. DISKUSSIONS UND ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser Arbeit besprochenen Zellseparationsmethoden beruhen sämtlich auf dem Prinzip der Zentrifugation, um die verschiedenen Zellelemente mit ihren unterschiedlichen spezifischen Gewichten trennen zu können.

Es sind drei - entsprechend ihrer Entwicklung - Methoden genannt worden:

1. Ein bestimmtes Blutvolumen (meist eine Vollblutkonserve) wird unter Verwendung eines Dreifachbeutelsystems dem Spender entnommen, in einer geeigneten Zentrifuge (Plasmafuge der Fa. Haraeus) zentrifugiert und das gewünschte Konzentrat in einem Transferbeutel gesammelt. Erythrozytenkonzentrat und Plasma werden vereinigt und dem Spender retransfundiert. Dieser Vorgang kann 4 - 6 mal wiederholt werden. Dieses arbeits- und zeitaufwendige Verfahren eignet sich für kleinere und mittlere Krankenanstalten sowie für die Bereitstellung von Thrombozyten- und Granulozytenkonzentraten im Bereich der Pädiatrie.

2. Ein vom Spenderhämatokrit abhängiges Blutvolumen wird in einer rotierenden Glocke bei einem bestimmten Blutflow gesammelt und gleichzeitig separiert und das gewünschte Konzentrat in einem Beutel gesammelt. Erythrozytenkonzentrat und Plasma werden anschließend wieder vereinigt und dem Spender retransfundiert. Dieser Vorgang wird 4 - 8 mal wiederholt und als sog. intermittend flow centrifugation, wie sie im Haemonetics-model 30 Anwendung findet.

3. Einem konstanten Blutflow von der einen zur anderen Armvene ist ein Zellseparator zwischengeschaltet, der die gewünschten Zellelemente kontinuierlich mittels Zentrifugation separiert und anreichert. Dieser Vorgang wird continuous-flow-centrifugation genannt und wird in den Zellseparatoren IBM und FENWAL CS 3000 angewendet.

Folgende Tabelle ergibt eine vergleichende Übersicht der Thrombopherese und Granulozytophorese der o.g. Methoden.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, werden die größten Thrombozytenausbeuten bei geringstem Zeitaufwand mit den Zellseparatoren Haemonetics-model 30 und FENWAL CS 3000 erzielt, wobei die Leukozyten- und Erythrozytenbeimengungen bei dem zweitgenannten Gerät wesentlich niedriger liegen. Die Granulozytenausbeuten/100 ml Vollblut sind bei den Separatoren IBM 2997 und FENWAL CS 3000 nahezu gleich, wobei hier jedoch die Thrombozytenbeimengung beim zweitgenannten Gerät wesentlich höher ist. Eine gute Granulozytenausbeute erhält man auch mit der Methode unter 1.), wobei hier jedoch eine Separationsdauer von ca. 3 Stunden zu beachten ist und unter Berücksichtigung der Halbwertzeit der Granulozyten von ca. 6 Stunden eine maximale Ausbeute von $1,0 \times 10^{10}$ Granulozyten ohne Sedimentationsbeschleuniger und Spenderkonditionierung mit Steroiden zu erreichen ist.

Geräte bzw. Zellseparatoren	Thrombozyten-Spenderausgangswert (10^3/ul)	verbreitetes Blutvol. (l)	Ausbeute ($\times 10^{11}$)	Ausbeute/1000 ml ($\times 10^{11}$)	Gesamtzeitaufwand (min)	Granulozyten verarbeitetes Blutvol. (l)	Ausbeute ($\times 10^{10}$)	Ausbeute 1000 ml Blutvol. ($\times 10^{9}$)	Thrombozytenbeimengung ($\times 10^{11}$)
einfache intermittierende Thrombophorese (Haereus-Plasmafuge) (1)	206	2,0	3,0	1,5	180	2,0	0,50	2,5(3	1,8-2,6
Haemonetics model 30	1) 205	3,0	4,3	1,43	120 (1				
	2) 276	2,79	4,8	1,72	150 (2				
IBM 2997 (2)	253	4,23	4,7	1,1	129	8,8	2,67	3,0	1,1
Fenwal CS(2)	273	2,84	4,1	1,44	111	6,4	1,83	2,9	4,5

1) eigene Untersuchungsergebnisse

2) Angaben aus Evaluation of the Fenwal CS 3000 Blood Cell Separator / D.H. BUCHHOLZ/ Travenol Laboratories

3) ohne Sedimentationsbeschleuniger und Konditionierung mit Steroiden

4) mit Sedimentationsbeschleuniger und Konditionierung mit Steroiden

Abschließend sind die wesentlichen Punkte der Grenzen der Zellseparation mittels Zentrifugation erwähnt:

Da die einzelnen Zellelemente naturgemäß - insbesondere Lymphozyten, Thrombozyten, Granulozyten - keine festen spezifischen Gewichte besitzen, diese sich von Zellart zu Zellart hingegen überschneiden, kann mit noch so hoher Zentrifugalkraft oder Separationsdauer keine absolute Trennung - auch nicht mittels Sedimentationsbeschleuniger - erreicht werden, was sich in den Trennprofilen widerspiegelt. Allenfalls ist mit Sedimentationsbeschleunigern und der Konditionierung mit Steroiden eine Anreicherung zu erzielen: einmal durch Pseudoagglutination der Erythrozyten, zum anderen durch Entleerung des marginalen Pools der Granulozyten und Anregung der Granulopoese. Der Vergleich der Granulozytenausbeute pro 1000 ml Vollblut mittels der Haeraeus-Plasmafuge und anschließender Trennung ohne SB und Konditionierung ($2{,}5 \times 10^9$ Granulozyten) und des Zellseparators IBM 2997 mit SB und Konditionierung ($3{,}0 \times 10^9$ Granulozyten) ist von geringer Bedeutung. Wesentlich ist hier nur die Separationsdauer! Und diese ist limitiert durch die Überlebenszeit der Granulozyten. Eine ebenbürtige Beachtung hat die Art der Zellseparation: zu hohe g-Zahlen, Roller-Pumpen mit ihren Saug- und Druckeinwirkungen, Fremdkörperkontakt schädigen die Zellelemente nicht nur in ihren spezifischen Aufgabenbereichen (insbesondere die Thrombozyten: Fremdkörperoberflächenkontakt, Granulozyten: Phagozytose), sondern auch in ihrer "viability".

Entscheidend ist hier also nicht, daß in möglichst kurzer Zeit viel buffy-coat gesammelt wird, sondern daß unter Berücksichtigung des Trennprofiles bei gegebener g-Zahl, Zentrifugationsdauer und Spenderflow die optimale Zone des gewünschten Zellelementes mit geringster "Verunreinigung" der nicht erwünschten Zellelemente separiert wird. Die Ausbeuten werden dann quantitativ geringer pro Zeiteinheit, aber qualitativ besser sein.

Ein interessanter Nebenaspekt dieser Arbeit ergibt sich, wenn man insbesondere die Thrombozytenausbeute in Abhängigkeit der Thrombozytenausgangswerte der einzelnen Spender berücksichtigt. In jedem Falle wird beobachtet, daß bei niedrigeren Thrombozytenausgangswerten bei verschiedenen Spendern eine höhere Thrombozytenausbeute erreicht wird. Ob diese objektive Feststellung auf eine verminderte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten oder auf eine vermehrte Ausschüttung aus dem marginalen Pool (Milz) bei Spendern mit Thrombozytenausgangswerten bei 100.000/ul herrühren, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Darüber hinaus darf der motivierte Spender - sei es ein Verwandter und/oder ein HLA-Kompatibler - durch die Art der oben aufgezeigten Separationstechniken nicht zu schaden kommen. Er hat ein ebenso großes Anrecht auf medizinische und labormedizinische Überwachung und psychologische Führung wie der Empfänger.

5. LITERATUR

BALDINI, M.G., N. COSTEA, N. and W. DAMESHEK: The viability of stored human platelets. Blood 16 1669 - 1692 (1960)

BECKER, G.A., M. TUCCEKKU, T. KUNICLI, M.K. CHALOS and R.H. ASTER: Studies of platelet concentrates stored at 22 C and 4 C Transfusion Philad. 13 61 - 68 (1973)

BENBUNAN, M., A. BUSSEL, M.J. GRANGE, J. REVIRON and J. BERNARD: Collection by blood cell separator and in vitro function of normal granulocytes
in: Leucocystes: Separation, collection and transfusion. Herausgeber: GOLDMANN, J.M., R.M. LOWENTHAL
Academic Press 1975, S. 81

BORBERG, H.: Präparative und klinische Aspekte der Thrombozyten- und Leukozytentransfusion mit Blutzellseparatoren
Transfusionsmed. Immunhaemat. 3 293 (1976)

BORBERG, H. und I. SLADECEK: Leukozytengewinnung durch Zentrifugationsmethoden
Symposium Leukozytentransfusion, Wetzlar 1978, S. 9

BUCHER, U., A. de WECK, H. SPENGLER, L. TSCHOPP and H. KUMMER: Plateled transfusion: shortened survival of HLA identical platelets and failure of in vitro detection of anti-plateled antibodies after multiple transfusion
Vox Sang. 25 187 - 192 (1973)

BUSSEL, A., M. BENBUNAN, J. TANZER and J. BERNARD: Report of a simple method of collecting leucocytes from patients with chronic myeloid leukaemia.
in: Leucocytes: Separation, collecting and transfusion
Herausgeber: GOLDMANN, J.M., R.M. LOWENTHAL
Academic Press 1975, S. 112

DJERASSI, I.: Gravity leucapheresis - a new method for collection of transfusable granulocytes
Exp. Hemat. 5, Suppl. 1 139 (1977)

DJERASSI, I., J.S. KIM and W. CIESIELKA: Gravidity leucophoresis - A practical technique for harvesting of human granulocytes for transfusion
in: Blood Leucocytes: Function and use in therapy.
Herausgeber: HÖGMANN, C.F., K. LINDAHL-KIESSLING, H. WIGZELL
Uppsala 1977, S. 68

FREIREICH, E.J.: Leucocyte collection by an in vivo continuous-flow centrifuge
J. Clin. Invest. 47 36 a (1968) Abstract 107

FREIREICH, E.J., G. JUDSON and R.H. LEVIN: Separation and collection of leucocytes
Cancer Res. 25 1516 - 1520 (1965)

GRAUBNER, M., WALDSCHMIDT, G. GAIL, H. LÖFFLER und C. MÜLLER-ECKHARDT: Untersuchungen zur Gewinnung von Leukozyten und Thrombozyten mit diskontinuierlicher Zellseparation und ihre Auswirkungen auf den Spender
Transfusionsmed. Immunhaemat. 3 331 (1976)

GRAW jr, R.G., G.P. HERZIG, R.J. EISEL and S. PERRY:
Leucocyte and plateled collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator
Transfusion, Philad. 11 94 - 101 (1971)

HANDIN, R.I. and C.R. VALERI: Hemostatic effectiveness of platelets stored ad 22°C
New Engl. J. Med. 285 538 - 543 (1971)

HUESTIS, D.W., L.M. GOODSITE, M.J. PRICE and R.F. WHITE
Granulocyte collection with the Haemonetics blood cell separator
in: Leucocytes: Separation, collection and transfusion
Herausgeber: GOLDMAN, J.M., R.M. LOWENTHAL
Academic Press 1975, S. 208

HUESTIS, D.W., R.F. WHITE, M.J. PRICE and M. INMAN:
Use of hydroxyethyl starch to improve granulocyte collection in the Latham blood processor
Transfusion 15 559 (1975)

HUESTIS, D.W.: Production, storage and histocompatibility of granulocytes
in: Blood Leucocytes, function and use in the therapy.
Herausgeber: HÖGMANN, C.F. , K. LINDAHL-KIESSLING, H. WIGZELL,
Uppsala 1977, S. 55

HUESTIS, D.W.: Intermittent flow centrifugation: Leucocyte production
in: Cell-separation and cryobiology
Herausgeber: RAINER, H., Schattauer-Verlag 1978, S. 157

KRETSCHMER, V., M. SCHMALHORST, K. BALSER, H. TEXTOR, C. MUELLER-ECKHARDT: Leukozytengewinnung durch Sedimentation
Symposium Leukozytentransfusion Wetzlar 1978, S. 67

LEVIN, R.H. and E.J. FREIREICH: Effect of storage up to 48 hours on response to transfusions of platelet rich plasma
Transfusion, Philad. 4 251 - 256 (1964)

LUNDSGAARD-HANSEN, P.: Volume limitations of plasmapheresis
Vox Sang. 32 20 (1977)

MAYER, K.: Transfusion of blood and blood components
Critical Care Med. 2 118 - 122 (1974)

McCREDIE, K.B., E,J. FREIREICH, J.P. HESTER and C. VALLEJOS: Increased granulocyte collection with the blood cell separator and the addition of etiocholanolone and hydroxyethyl starch
Transfusion, 14 357 - 364 (1974)

McCULLOUGH, J.: Blood component therapy
Geriatrics 29 85 - 93 (1974)

MISHLER, J.M.: Donor conditioning agents. Usage and effects on in-vitro and in-vivo neutrophil function
in: Cell-separation and cryobiology
Herausgeber: RAINER, H., SCHATTAUER-VERLAG 1978, S.20

MURPHY, S., S.N. SAYAR and F.H. GARDNER: Storage of platelet concentrates at 22°C
Blood 35 549 - 557 (1970)

PFISTERER, H., H. HOLLAND, J. NENNHUBER und W. STICH: Lymphozytenabbau nach in-vitro-Markierung mit $Na_2{}^{51}Cr\ O_1$ (Methode und Ergebnisse bei Normalpersonen)
Klin. Wschr. 19 995 (1967)

Richtlinien für Plasmapherese
Dtsch Ärzteblatt 74 305 (1977)

ROY, A.J., W.B. SIMMONS, A. FRANKLIN and I. DJERASSI: Hydroxyethyl starch for separation of normal granulocytes
Fed. proc. 29 424 (1970)

ROY, A.J., A. FRANKLIN, W.B. SIMMONS and I. DJERASSI: A method for separation of granulocytes from normal human blood usin hydroxyethyl starch
Prep. Biochem. 1 197 (1971)

SCHIFFER, C.A., D.H BUCHHOLZ and P.H. WIERNIK: Intensive plateletpheresis of normal donors and its clinical application

SCHNEIDER, W., G. STÜTZL: Neues Verfahren zur Herstellung von leukozyten-thrombozytenarmen Erythrozytensedimenten
Med Welt 1597-1601 (1979)

SEIDL, S.: Die Thrombozytentransfusion
G. Fischer Verlag, Stuttgart 1968

STRAUSS, R.G., M.M. GOEDKEN, L.C. MAGUIRE, J.A., KOEPKE and J.S. THOMPSON: Combined platelet-leucapheresis: A technique for preparing separate platelet and granulocyte-platelet units from single donors
Transfusion 19 (1979)

SUSSMAN, L.N.: Technique for maximum yields of platelets and granulocytes
Haemonetics Res. Institute, 1976

SUSSMAN, L.N. and W. COLLI: Harvesting of platelets and granulocytes using hydroxyethyl starch and dexamethasone
Haemonetics Res. Institute, 1975

SUSSMAN, L.N. and W. COLLI: Harvesting of granulocytes using a hydroxyethyl starch solution
in: Leucocytes, Separation, collection and transfusion
Herausgeber: GOLDMAN, J.M., R.M. LOWENTHAL
Academic Press 1975, S. 220

SUSSMAN, L.N., W. COLLI and C. PICHETSHOTE: Harvesting of granulocytes using a hydroxyethyl starch solution
Transfusion 15 461 (1975)

TULLIS, J.L., R.J. TINCH, P. BAUDANZA, J.G. GIBSON and S. DiFORTE: Plateletpheresis in an disposable system
Transfusion 11 368 (1971)

LEBENSLAUF

Am 9. Mai 1943 wurde ich, Georg Ulrich Wollmann, als dritter Sohn des Chefarztes und Gynäkologen Dr.med. Herbert Wollmann und dessen Ehefrau Traute Wollmann, geb. Knall, in Berlin geboren.

1949 - 1953	Besuch der Grundschule in Berlin
1954 - 1960	Besuch des Canisius-Kollegs in Berlin
1960 - 1964	Besuch des Grunewald-Gymnasiums in Berlin (Zeugnis der Reife am 2.3.1964)
20.4.1964	Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin
SS 1965	Vorphysikum an der FU Berlin
SS 1967	Beginn des Physikstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
WS 1969/70	Wiederaufnahme des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, parallel zum Physikstudium
SS 1970	Physikum
9.5. 1974	Staatsexamen in Tübingen
Mai 74 bis Mai 75	MA, Med. Universitätsklinik Tübingen MA, KKH Stockach (Chirurgie) MA, KKH Böblingen (Chirurgie)
15.5.1975	Bestallung als Arzt
1975 - 1976	Ass.-Arzt in der Chirurg. Abt. des KKH Böblingen (Prof.Dr. Zettler)
1976	Ass.-Arzt in der Chirurg. Abt. der Diakonissenanstalt Flensburg (Prof.Dr. Gieseler)
1976 - 1978	Ass.-Arzt in der Abteilung für Anaesthesie im KKH Niebüll / NF (Chefarzt P. Müller)
seit dem 6.3.1978	Ass.-Arzt im Zentralinstitut für Anaesthesiologie der Universität Tübingen (Professor Dr. Schorer)
zwischenzeitlich 1979 - 1980	Abt. für Transfusionswesen der Universität Tübingen (Professor Dr. Schneider)
11.6.1980	Anerkennung zum Facharzt

verheiratet seit 1965; drei Kinder